

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

AG

(11)Publication number : 2002-114799

(43)Date of publication of application : 16.04.2002

(51)Int.Cl.

C07K 1/34
C07K 14/745
C07K 14/76
C12N 7/00
C12N 9/10

(21)Application number : 2001-233937

(71)Applicant : NIHON PHARMACEUTICAL CO LTD

(22)Date of filing : 01.08.2001

(72)Inventor : MATSUO TAKAHITO
KANEKO HIROSHI
OSHIMA KAZUNORI

(30)Priority

Priority number : 2000233215 Priority date : 01.08.2000 Priority country : JP

(54) METHOD FOR REMOVING VIRUS

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for removing viruses more efficiently industrially in a method for removing viruses from a protein solution having a fear of virus admixture by using a filter.

SOLUTION: A protein solution of acquisition target is formulated with another water-soluble protein not substantially affecting activity of a protein of acquisition target to solve the subject.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-114799

(P2002-114799A)

(43) 公開日 平成14年4月16日 (2002.4.16)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	ターマコード*(参考)	
C 0 7 K	1/34	C 0 7 K	1/34	4 B 0 5 0
	14/745		14/745	4 B 0 6 5
	14/76		14/76	4 H 0 4 5
C 1 2 N	7/00	C 1 2 N	7/00	
	9/10		9/10	
審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 6 頁)				

(21) 出願番号 特願2001-233937 (P2001-233937)
(22) 出願日 平成13年8月1日 (2001.8.1)
(31) 優先権主張番号 特願2000-233215 (P2000-233215)
(32) 優先日 平成12年8月1日 (2000.8.1)
(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000231648
日本製薬株式会社
東京都千代田区東神田1丁目9番8号
(72) 発明者 松尾 宇人
千葉県成田市新泉3番地の1 日本製薬株
式会社成田工場内
(72) 発明者 金子 博
千葉県成田市新泉3番地の1 日本製薬株
式会社成田工場内
(74) 代理人 100071973
弁理士 谷 良隆

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウイルス除去方法

(57) 【要約】

【課題】 ウイルス夾雑の危惧のある蛋白溶液のフィルターを用いるウイルス除去法に於いて、工業的により効率の良いウイルス除去方法を提供する。

【解決手段】 取得目的の蛋白溶液に取得目的蛋白の活性に実質的に影響を与えない他の水溶性蛋白を含有せしめることにより前記課題を解決した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ウイルスが混在するおそれのある取得目的の蛋白の溶液からウイルス除去フィルターを用いてウイルスを除去する方法において、該溶液に取得目的の蛋白の活性に実質的に影響を与えない他の水溶性蛋白を溶解共存させるウイルス除去方法。

【請求項2】 取得目的の蛋白が生体由来のものである請求項1記載のウイルス除去方法。

【請求項3】 取得目的の蛋白がトランスグルタミナーゼである請求項1記載のウイルス除去方法。

【請求項4】 取得目的の蛋白が血液凝固第XIII因子である請求項1記載のウイルス除去方法。

【請求項5】 他の水溶性蛋白がアルブミンである請求項1記載のウイルス除去方法。

【請求項6】 取得目的蛋白の溶液中のアルブミン濃度が0.01～5重量%である請求項5記載のウイルス除去方法。

【請求項7】 ウイルス除去フィルターが10～80nmの平均孔径を有するものである請求項1記載のウイルス除去方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、ウイルス混在のおそれのある取得目的の蛋白の溶液から、ウイルス除去フィルターを用いてウイルスを除去する方法において、取得目的の蛋白の活性に実質的に影響を与えない他の水溶性蛋白を同時に溶解せしめることにより、濾過効率を高め、より工業的有利に蛋白溶液からウイルス除去方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 蛋白、特に生体由来の蛋白、より具体的には血液由来の蛋白は、エイズウイルス、各種肝炎ウイルス、ヒトパルボウイルスB19などの種々のウイルスに汚染されている可能性がある。したがって、これらを原料とした治療剤の製造に際しては、ウイルスを十分に除去または不活化する工程を組み込むことが必須である。血液由来の製剤、すなわち血液製剤に夾雑してくるウイルスを不活化する方法としては、水溶液状態での加熱処理法（以下、液状加熱法という。）がMurrayら（The New York Academy of Medicine, 31巻（5）341～358（1955））により提案され、それ以来この方法は血液製剤のウイルス不活化法として広く採用されている。しかし、この液状加熱法に耐え得る熱に安定な蛋白はアルブミンなどごく一部のものに限られ、他の多くの血漿蛋白は熱に不安定で、この方法によっては変性、失活する割合が高い。

【0003】 そこでこの液状加熱法とは別に、蛋白を乾燥状態で加熱する乾燥加熱法（特開昭58-213721号）、特殊な溶媒と洗浄剤を用いるソルベントデタージェント法（SD法）（特開昭60-51116号）な

ども提案されている。また、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーによってもウイルスの除去が可能であることが報告されている（Developments in Biological Standardization, Vol., 81, 199～209（1993））。しかし、これらのいずれの方法も一長一短があり、1つの方法で各種ウイルスの完全不活または完全除去は期し難く、従って複数の方法を組み合わせる用いることが有効であると考えられるが、そのためには個々の処理工程における蛋白の変性、不活性化を極力抑え、収率の低下を防ぐことが工業的生産の見地から重要となってくる。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 前述した液状加熱法は、ウイルスの不活化という点では優れた方法の1つではあるが、蛋白が液状で比較的長時間、60℃前後の高い温度に曝される結果、アルブミン等熱に安定な数少ない蛋白を除き、多くの血漿蛋白は溶液状態では熱に不安定で、変性、失活する率が高い。血漿蛋白の中でもトランスグルタミナーゼの一つである血液凝固第XIII因子は、熱に不安定であるので、液状加熱法による収率低下を防ぐためこれまでも種々の提案がなされてきた。その方法として、たとえば第XIII因子含有溶液にグリシン、アラニン等のアミノ酸、グルコース、マンニトールなどの糖類を10～20重量%添加する方法（特開昭53-59018号）、グリシンと蔗糖を併用する方法（特開昭55-145615号）などが報告されているが、これらの方法も加熱による蛋白の変性や失活を十分に抑制することはできず、またこれらの変性体や不活性体が最終製品の品質に何らかの影響を及ぼす可能性も否定し得ない。

【0005】 そこで、加熱によらず、フィルターを用いてウイルスを除去する方法が開発された。例えば、ウイルスを含有する可能性のある有用蛋白原料を多孔膜であるウイルス除去フィルターを用いて多段的に濾過することによるウイルス除去方法（特開平10-337445号）、血液凝固第VIII因子製剤を銅アンモニア法再生セルロース製多孔膜中空糸を用いて多段に濾過する方法（特開平2-167232号）や免疫グロブリン製剤の製造工程中にウイルス除去用中空糸フィルターによる濾過工程を導入し、ウイルスを除去する方法（Japanese Journal of Transfusion Medicine, 34巻（6）、615～617（1988））などが報告されている。

【0006】 しかしこれらのフィルターを用いてウイルスを除去する方法の問題点は、フィルターが目詰まりを起こし、濾過が困難になるかまたは不能となることである。さらに取得目的の蛋白がフィルターに吸着され、収率が低下するという問題もあった。特に血液凝固第XIII因子製剤は胎盤由来や血液由来のものがあるが、いずれも濾過が困難であるところから、これまでフィルターによるウイルス除去は行われていない。

10

20

30

40

50

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、前記課題を解決するため種々の研究を重ねた結果、取得目的の蛋白の溶液、特にトランスグルタミナーゼ、より具体的には血液凝固第XIII因子をウイルス除去フィルターを用いて濾過する際に、取得目的の蛋白の活性に実質的に影響を与えない他の水溶性蛋白を含有せしめることによって、取得目的の蛋白が安定化され、取得目的の蛋白のウイルス除去フィルターへの吸着を抑制し、且つウイルス除去能を維持したままで優れた濾過性を示すことを見だし、さらに検討を重ねて本発明を完成した。すなわち本発明は

【0008】(1) ウイルスが混在するおそれのある取得目的の蛋白の溶液からウイルス除去フィルターを用いてウイルスを除去する方法において、該溶液に取得目的の蛋白の活性に実質的に影響を与えない他の水溶性蛋白を溶解共存させるウイルス除去方法、(2) 取得目的の蛋白が生体由来のものである前記(1)記載のウイルス除去方法、(3) 取得目的の蛋白がトランスグルタミナーゼである前記(1)記載のウイルス除去方法、(4) 取得目的の蛋白が血液凝固第XIII因子である前記(1)記載のウイルス除去方法、(5) 他の水溶性蛋白がアルブミンである前記(1)記載のウイルス除去方法、(6) 取得目的の蛋白の溶液中のアルブミン濃度が0.01~5%重量である前記(5)記載のウイルス除去方法、および(7) ウイルス除去フィルターかつ10~80nmの平均孔径を有するものである前記(1)記載のウイルス除去方法。である。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明のウイルス除去方法の対象となる取得目的蛋白は、生体成分由来のものであれば特に限定されず、ウイルスの夾雑が危惧される蛋白、たとえば血漿、尿、胎盤、皮膚、骨、肺などの生物由来の蛋白、細胞培養由来の蛋白等があげられる。本発明は、液状加熱に対して不安定なトランスグルタミナーゼ、特に第XIII因子の処理に好適である。取得目的蛋白溶液における蛋白の濃度は特に限定されないが、通常0.01~30.0重量%、好ましくは0.03~10.0重量%である。蛋白が第XIII因子である場合の濃度は、0.05~3.0重量%であることが好ましい。取得目的蛋白溶液には、必要に応じ、安定化剤としてグリシン、アラニン等のアミノ酸を0.1~3モル濃度、グルコース、マンニトール、蔗糖などの糖類を10~50重量%程度添加してもよい。その他緩衝液として、たとえばクエン酸緩衝液を添加してもよい。蛋白溶液のpHは、通常5.0~10.0、好ましくは6.0~8.5である。取得目的の蛋白の活性に実質的に影響をあたえない他の水溶性蛋白としては、取得目的の蛋白の活性に影響をあたえない水溶性蛋白であれば特に限定されないが、好ましくはアルブミン、カゼイン、ゼラチン等の蛋白質、ペプ

トン類のような蛋白の酵素消化物などが用いられる。アルブミン自身はそれ自体触媒活性を持たず、トランスグルタミナーゼ活性には影響を与えないことから本発明にとって有用である。

【0010】ゼラチンの中では特に水溶性ゼラチンが有用であり、これは平均分子量が約15000以下の低分子のもので、普通のゼラチンと異なり常温で水に解けてゲル化しないことから、粘性が要求されない本発明において好ましく用いることができる。これらの中でもウイルス除去フィルター処理後に除去が容易であるか、最終製剤に混在しても品質管理上問題のない蛋白が好ましく、特に好ましいものはアルブミンである。取得目的の蛋白溶液中の他の水溶性蛋白の濃度は通常0.01~5.0重量%、好ましくは0.05~2.0重量%である。

【0011】本発明に用いるウイルス除去フィルターは、多孔膜であれば平膜状でも中空糸状でもよく、またその材料としては銅アンモニア法、ビスコース法、セルロースエステルのケン化法などの再生セルロース、アセテートなどの酢化セルロース、ポリフッ化ビニリデン(PVDF)、ポリアクリロニトリル(PAN)、ポリスルホン(PS)及びポリメチルメタクリレート(PMMA)等の合成高分子化合物があげられる。その中でも銅アンモニア法再生セルロース製多孔膜中空糸が特に好ましい。銅アンモニア法再生セルロースは親水性で且つ蛋白の吸着性が低く、また銅アンモニア法再生セルロースからなる多孔膜中空糸は既存の中空糸の中でも一番吸着性が低い。銅アンモニア法再生セルロース製多孔膜中空糸は流水速法で測定した平均孔径が10~100nmの範囲にあり、しかも壁厚全層においてスキン構造を有さない。また、銅アンモニア法再生セルロース製多孔膜中空糸は該中空糸の内壁面から外壁面への膜厚方向に層状構造を有しているので、高い蛋白の透過性と高いウイルスの阻止性能を併せ持っている。この中空糸の膜厚は10~100μmが好ましく、50~90μmがさらに好ましい。ウイルス除去フィルターの平均孔径は、通常10~80nm、好ましくは15~75nm、より好ましくは30~50nmである。平均孔径が20nm以下のフィルターを用いると、パルボウイルスB19のような粒子径の小さなウイルスも除去することができる。またフィルターは平均孔径の異なるフィルターを孔径の大なるものから小なるものへと多段に使用することにより、より濾過工程を高めることができる。好適に用いられる具体的なフィルターは、プラノバ35N(平均孔径35±2nm、旭化成(株)製)およびプラノバ15N(平均孔径15±2nm、旭化成(株)製)である。

【0012】血漿から第XIII因子含有溶液を調製するための具体的な方法としてはたとえば次の方法があげられる。まず、コーン低温エタノール分画の画分Iを採取し、0.02Mクエン酸緩衝液(pH7.5)を加え、

10

20

30

40

50

ミキサーで画分を十分に攪拌して溶解させる。この溶液を遠心分離器により3000g、20℃で15分間遠心分離し上清を得る。この上清に、1Mクエン酸緩衝液（pH7.5）をゆっくりと加え、攪拌後20℃で1時間放置する。この溶液を再び遠心分離器にて3000g、10℃で15分間遠心分離し、沈殿物を濾取する。この沈殿物を0.02Mクエン酸緩衝液（pH7.5）に溶解し、56℃、3分間加熱処理して熱変性物を遠心分離して上清を得る。この上清を陰イオンクロマトグラフで処理し、吸着画分から第XIII因子を含む溶液を得ることができ。また、胎盤由来の第XIII因子含有溶液を調製する具体的な方法としては次の方法があげられる。

【0013】まず凍結した人の胎盤に0.5%食塩溶液を添加後、組織を含まない上澄みからアクリジン塩基を用いて第XIII因子を析出させる。2.5%食塩水を用いてアクリジン付加物を溶解させ、セチルピリジニウムクロリドにより第XIII因子含有溶液から酸性の付加蛋白と脂質を除く。再度アクリジン塩基を用いて第XIII因子を析出させ、2.5%食塩で抽出し、抽出液を硫酸アンモニウムを用いる沈殿及びゲル濾過により精製する。第XIII因子活性画分を合し、濾過または中性塩沈殿法によりさらに濃縮して第XIII因子濃縮物とする。第XIII因子含有溶液の活性は、例えばダンシルカダペリン法（Tromb. Res., 36巻、123~131頁（1984））、クロット溶解法（J. Biol. Chem., 236巻、2625~2633（1961））などの方法により測定することができる。本発明においてはこのようにして調製された取得目的の蛋白の溶液に上記他の水溶性蛋白を添加し、そのまま、または種々の予備濾過を施した後ウイルス除去フィルター処理を施すのであるが、このようにして調製された蛋白溶液は従来にない高い濾過性並びに取得目的蛋白の回収性を示す。さらに上記他の水溶性蛋白を含有した取得目的の蛋白溶液はすべてのフィルターに対して高い膜濾過相関性を持つため、例えば、工業上頻用される限外濾過膜を使用する際にも従来にない高濃度で安定的に濃縮することが可能となり、しかも高い回収率で回収することができる。

【0014】

【実施例】以下に実施例、比較例および試験例をあげて本発明を具体的に説明する。

実施例1

コーン低温エタノール分画の画分Iを約1Kg採取し、これに5リットルの0.02Mクエン酸緩衝液（pH7.5）を加え、ミキサーにて画分Iを十分に攪拌しながら溶解した。この溶液を遠心分離器により3000g、20℃で15分間遠心分離し上清を得た。この上清に、2.5リットルの1Mクエン酸緩衝液（pH7.5）をゆっくりと添加攪拌し、20℃で1時間放置した。この溶液を再び3000g、10℃で15分間遠心分離して沈殿物を採取した。この沈殿物に3リットルの

0.02Mクエン酸緩衝液（pH7.5）を加えて溶解し、56℃、3分間加熱処理を行い、遠心分離器により3000g、20℃で15分間遠心分離して上清を得ることで熱変性物を分離した。これを0.02Mクエン酸緩衝液（pH7.5）で平衡化した陰イオン交換体（DEAEセファロースCL-6B；ファルマシア社製）に負荷し、0.1M塩化ナトリウム溶液で溶出した画分1リットルを限外濾過膜を用いて濃縮し、約120倍/mlとなるように第XIII因子の力価を調整した。得られた溶液に塩化ナトリウムを0.1M、アルブミンを0.8%となるように添加した後、0.2μmの平均孔径を有するフィルター（商品名：ミリパック、ミリポア社製）で予備濾過を施した試料15.0mlをデッドエンド法により平均孔径35nmのウイルス除去フィルター（ブラノバ35N、0.01m² 旭化成（株）製）で濾過した。試料を濾過した後0.01Mクエン酸緩衝液（0.1mM塩化ナトリウム含有、pH7.5）100mlを通過させ、濾液として得られた溶液と試料の濾液とを混合した。混合液の第XIII因子力価を血液凝固試験用標準ヒト血漿（ヘキスト社）を標準としてダンシルカダペリン法により測定し、得られた数値に容量を乗じた数値（総倍）と濾過前の第XIII因子力価に容量を乗じた数値（総倍）より濾過前後の収率を算出し、その結果を〔表1〕に示した。

【0015】比較例1

コーン低温エタノール分画の画分Iを約1Kg採取し、実施例1と同様に処理して熱変性物を分離した上清を得た。これを0.02Mクエン酸緩衝液（pH7.5）で平衡化した陰イオン交換体（DEAEセファロースCL-6B；ファルマシア社製）に負荷し、0.1M塩化ナトリウム溶液で溶出した画分1リットルを限外濾過膜を用いて濃縮し、約120倍/mlとなるように第XIII因子の力価を調整した。力価を調整した溶液に塩化ナトリウムを0.1Mとなるように添加した後、0.2μmの平均孔径を有するフィルター（ミリパック、ミリポア社製）で予備濾過を施した試料15.0mlをデッドエンド法により平均孔径35nmのウイルス除去フィルター（ブラノバ35N、0.01m²、旭化成（株）製）を通過させた。試料を濾過した後1mMクエン酸緩衝液（0.1mM塩化ナトリウム含有、pH7.5）100mlを通過させ、濾液として得られた溶液と試料の濾液とを混合した。混合液の第XIII因子力価を血液凝固試験用標準ヒト血漿（ヘキスト社）を標準としてダンシルカダペリン法により測定し、得られた数値に容量を乗じた数値（総倍）と濾過前の第XIII因子力価に容量を乗じた数値（総倍）より濾過前後の収率を算出し、その結果を〔表1〕に示した。

【0016】比較例2

コーン低温エタノール分画の画分Iを約1Kg採取し、実施例1と同様に処理して、熱変性物を分離した上清を

10

20

30

40

50

得た。これを0.02Mクエン酸緩衝液（pH7.5）で平衡化した陰イオン交換体（DEAEセファロースCL-6B；ファルマシア社製）に負荷し、0.1M塩化ナトリウム溶液で溶出した画分1リットルを限外濾過膜を用いて濃縮し、約120倍／mlとなるように第XIII因子の力価を調整した。力価を調整した溶液に塩化ナトリウムを0.1M、グルコースを2.0%となるように添加した後、0.2μmの平均孔径を有するフィルター（ミリパック、ミリポア社製）で予備濾過を施した試料15.0mlをデッドエンド法による平均孔径35nm10【0017】のウイルス除去フィルター（プラノバ35N、0.01【表1】

第XIII因子の濾過前後の力価と活性収率

		濾過前	濾過後
実施例1	力価（総倍）	1925.9	1676.5
	活性収率（%）	100.0	87.1
比較例1	力価（総倍）	1644.0	1208.9
	活性収率（%）	100.0	73.5
比較例2	力価（総倍）	1794.0	1330.3
	活性収率（%）	100.0	74.2

【表1】から明らかなように塩化ナトリウムのみを添加した比較例1に比べアルブミンを添加した実施例1はウイルス濾過処理後の活性収率が大きく向上した。またこの現象は比較例2に示したようにグルコースを添加した実験では活性収率が改善できないことから、実施例1の

【0018】実施例2

コーン低温エタノール分画の画分Iを約1Kg採取し、実施例1と同様に処理し、熱変性物を分離して上清を得た。これを0.02Mクエン酸緩衝液（pH7.5）で平衡化した陰イオン交換体（DEAEセファロースCL-6B；ファルマシア社製）に負荷し、0.1M塩化ナトリウム溶液イオン交換体に負荷し20mMクエン酸緩衝液で溶出した画分を得、約12倍／mlとなるように第XIII因子の力価を調整した。力価を調整した溶液に塩化ナトリウムを0.1M、アルブミンを0.05%となるように添加した後0.2μmの平均孔径を有するフィルター（ミリパック、ミリポア社製）で予備濾過を施した試料400mlをデッドエンド法により平均孔径35nmのウイルス除去フィルター（プラノバ35N、0.01m²、旭化成（株）製）を通過させた。試料を濾過した後1mMクエン酸緩衝液（0.1mM塩化ナトリウム含有、pH7.5）100mlを通過させ、濾液として得られた溶液と試料の濾液とを混合した。混合液の第

m²、旭化成（株）製）を通過させた。試料を濾過した後1mMクエン酸緩衝液（0.1mM塩化ナトリウム含有、pH7.5）100mlを通過させ、濾液として得られた溶液と試料の濾液とを混合した。混合液の第XIII因子力価を血液凝固試験用標準ヒト血漿（ヘキスト社）を標準としてダンシルカタベリン法により測定し、得られた数値に容量を乗じた数値（総倍）と濾過前の第XIII因子力価に容量を乗じた数値（総倍）より濾過前後の収率を算出し、その結果を【表1】に示した。

XIII因子力価を血液凝固試験用標準ヒト血漿（ヘキスト社）を標準としてダンシルカタベリン法により測定し、得られた数値に容量を乗じた数値（総倍）と濾過前の第XIII因子力価に容量を乗じた数値（総倍）より濾過前後の収率を算出し、その結果を【表2】に示した。

【0019】比較例3

コーン低温エタノール分画の画分Iを約1Kg採取し、実施例1と同様に処理して、熱変性物を分離した上清を得た。これを0.02Mクエン酸緩衝液（pH7.5）で平衡化した陰イオン交換体（DEAEセファロースCL-6B；ファルマシア社製）に負荷し、0.1M塩化ナトリウム溶液で溶出した画分を得、約12倍／mlとなるように第XIII因子の力価を調整した。力価を調整した溶液に塩化ナトリウムを0.1Mとなるように添加した後0.2μmの平均孔径を有するフィルター（ミリパック、ミリポア社製）で予備濾過を施した試料400mlをデッドエンド法により平均孔径35nmのウイルス除去フィルター（プラノバ35N、0.01m²、旭化成（株）製）を通過させた。試料を濾過した後1mMクエン酸緩衝液（0.1mM塩化ナトリウム含有、pH7.5）100mlを通過させ、濾液として得られた溶液と試料の濾液とを混合した。混合液の第XIII因子力価を血液凝固試験用標準ヒト血漿（ヘキスト社）を標準としてダンシルカタベリン法により測定し、得られた数値に容量を乗じた数値（総倍）と濾過前の第XIII因子力価

30

40

50

に容量を乗じた数値（総倍）より濾過前後収率を算出【0020】
し、その結果を〔表2〕に示した。【表2】

第 XIII 因子の濾過前後の力価と活性収率

		濾過前	濾過後
実施例 2	力価（総倍）	4530.5	4410.5
	活性収率（％）	100.0	97.4
比較例 3	力価（総倍）	5072.0	4279.9
	活性収率（％）	100.0	84.4

〔表2〕から明らかなように、実施例2においてはアルブミン濃度が0.05%と低濃度であっても濾過後の活性収率は比較例3に比べて明らかに高く、優れた回収性を示すことが証明された。

【0021】試験例1

実施例1で調製したウイルス除去膜処理を行う前の試料9容に対し、ウシ下痢症ウイルス（BVDV）液1容を加え下記に示すBVDV感染価測定方法に従って試料中のウイルス感染価を測定した。比較例1についても同様にウイルス感染価を測定した。その結果を〔表3〕に示した。

【0022】ウシ下痢症ウイルス（BVDV）感染価の測定方法

マイクロプレートを用い37℃、5%炭酸ガス培養器で培養したBT（Bovine Testis）細胞でウシ下痢症ウイルスの感染価の測定を行った。試料は日本薬局方注射用水で溶解した。ウイルス感染価の測定方法としてはウシ下痢症ウイルスのBT細胞に対する細胞変性効果を確認することによりおこなった。すなわち、ウイルスを含む試料をBT細胞培養地で10倍段階希釈してBT細胞に接種した。引き続き炭酸ガス培養器で7日間培養し細胞変性効果を確認してウイルス感染価TCID₅₀/mlを測定した。

【0023】

【表3】

BVDV 除去効果

	ウイルス除去フィルター処理	ウイルス感染価*
実施例 1	濾過前	6.00
	濾過後	≤0.50
比較例 1	濾過前	5.50
	濾過後	≤0.50

*数値：ウイルス感染価（logTCID₅₀/ml）

【0024】〔表3〕から明らかな通り、実施例1の方法によるウイルス除去効果は比較例1の方法によるウイルス除去効果と比べ遜色なく、良好なウイルス除去効果を示した。

【0025】

【発明の効果】本発明によれば、ウイルス混在のおそれのある取得目的蛋白溶液からウイルス除去フィルターを用いてウイルスを除去する方法において、液の濾過性を高め、より効率的なウイルス除去が可能となる。また、本法により得られる蛋白溶液はすべてのフィルターに対して高い膜濾過相関性を持つため、ウイルス除去フィルター処理後の工程においても限外濾過等他の種々の濾過工程を継続して実施することが可能となる。

フロントページの続き

(72)発明者 大嶋 一紀
千葉県成田市新泉3番地の1 日本製薬株式会社成田工場内

Fターム(参考) 4B050 CC10 FF05C LL01
4B065 AA95X BD18 CA24 CA44
4H045 AA20 CA10 CA40 DA66 DA89
EA20